

Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-508879

(43) 公表日 平成8年(1996)9月24日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 31/70	A D U	8314-4C	A 6 1 K 31/70	A D U
35/78		7431-4C	35/76	
39/00		9284-4C	39/00	A
48/00		8314-4C	48/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-522838
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)4月15日
 (85) 優先文提出日 平成7年(1995)10月19日
 (86) 国際出願番号 PCT/FR94/00421
 (87) 国際公開番号 WO94/24297
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)10月27日
 (31) 優先権主張番号 93/04745
 (32) 優先日 1993年4月22日
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, FI, HU, J P, NO, NZ, US

(71) 出願人 ローネー・ブーラン・ロレ・ソシエテ・アノニム
 フランス国エフ-92160アントニイ・アベニューレイモンド・アロン20
 (72) 発明者 ベリコーデ, ミシエル
 フランス国エフ-28320エクロスヌ・リュドシヤルトル31
 (72) 発明者 ハダダ, ヘデイ
 フランス国エフ-94140アルフオールビル・リュジユール・グズド1・アバルトマン221
 (74) 代理人 弁護士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍の遺伝子療法のための欠陥組換えアデノウイルス

(57) 【要約】

異種DNA配列を含む組換えアデノウイルス、その調製法、ならびに癌の治療および/または予防のためのその使用。

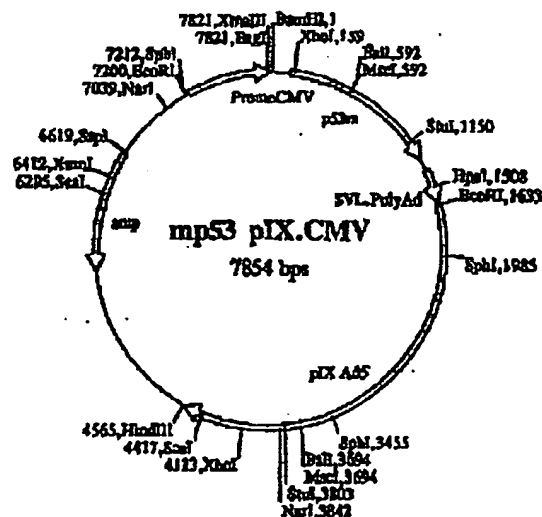


FIGURE 2

【特許請求の範囲】

1. 標的細胞中におけるその発現が少なくとも部分的に細胞分裂を阻害することを可能にさせる異種DNA配列を含む欠陥組換えアデノウイルス。
2. 標的細胞中でのそれ自体の複製に必要なそれ自体のゲノムの領域を欠損することを特徴とする、請求の範囲1に記載のアデノウイルス。
3. タイプAd5アデノウイルスであることを特徴とする、請求の範囲2に記載のアデノウイルス。
4. 異種DNA配列が少なくとも一つの腫瘍抑制遺伝子もしくはそのような遺伝子の活性誘導体を含むことを特徴とする、請求の範囲1～3の内の一つに記載のアデノウイルス。
5. 腫瘍抑制遺伝子が、p53、Rb、rap 1A、DCC、k-rev2、およびk-rev3遺伝子、もしくはその活性誘導体から選択されることを特徴とする、請求の範囲4に記載のアデノウイルス。
6. 異種DNA配列が、標的細胞中でのその発現が細胞増殖に有利な遺伝子の転写もしくは翻訳を調節することを可能にさせる少なくとも一つのアンチセンス遺伝子を含むことを特徴とする、請求の範囲1～3の内の一つに記載のアデノウイルス。
7. アンチセンス遺伝子が、ras、myc、fos、および/またはc-erbB癌遺伝子の翻訳のレベルを減少させることを可能にさせることを特徴とする、請求の範囲6に記載のアデノウイルス。
8. 異種DNA配列が、その発現産物が感染細胞のアポトーシスを誘導する少なくとも一つの遺伝子を含むことを特徴とする、請求の範囲1～3の内の一つに記載のアデノウイルス。
9. 異種DNA配列が、細胞分裂を少なくとも部分的に阻害する遺伝子の感染細胞中での発現を可能にさせるプロモーター配列を含むことを特徴とする、請求の範囲1～8の内の一つに記載のアデノウイルス。
10. 異種DNA配列がその上に、腫瘍特異的抗原をコードする遺伝子および/またはリンホカインをコードする遺伝子を含むことを特徴とする、請求の範囲

1～9の内の一つに記載されるアデノウイルス。

11. 病の治療および/または予防が意図される薬剂的組成物の調製のための、請求の範囲1～10の内の一つに記載のアデノウイルスの使用。

12. 治療予定の腫瘍内への直接的投与のための薬剂的組成物の調製のための、請求の範囲11に記載の使用。

13. 抗腫瘍ワクチンの調製のための、請求の範囲11に記載の使用。

14. 請求の範囲1～10の内の一つに記載の一つもしくは複数の欠陥組換えアデノウイルスを含む薬剂的組成物。

15. 注射用形態であることを特徴とする、請求の範囲13に記載の薬剂的組成物。

16. 10^4 pfu/mlと 10^{10} pfu/mlとの間、そして好ましくは $10^6 \sim 10^{10}$ pfu/mlの欠陥組換えアデノウイルスを含むことを特徴とする、請求の範囲13に記載の薬剂的組成物。

【発明の詳細な説明】

腫瘍の遺伝子療法のための欠陥組換えアデノウイルス

本発明は、ウイルス起源の組換えベクターおよび癌の治療のためのそれらの使用に関する。より具体的には本発明は、異常分裂性細胞内におけるその発現が前記細胞の分裂を少なくとも部分的に阻害することを可能にさせる異種DNA配列を含む組換えアデノウイルスに関する。本発明はまた、これらのベクターの調製法およびそれらを含む薬劑学的組成物に関する。

細胞成長は2つの種類のシグナルにより極端に巧妙な様式で調節される。幾つかのものは細胞の増殖に有利である一方で、それとは対称的に他のものは体の必要性に依存して細胞を休止状態に入らせたり、あるいは細胞を分裂させたりする。全ての癌は細胞分裂を制御する機構の破壊を特徴とし、異常増殖がもたらされる。従って癌の進展は細胞の増殖に有利である遺伝子の活性化（癌原遺伝子と表示される遺伝子で、これは癌遺伝子へと活性化される）、および細胞増殖を阻害する遺伝子の消失もしくは不活化を必要とする。本発明は、その発現が少なくとも部分的に細胞増殖を阻害することを可能にさせる一つもしくは複数のこれらの遺伝子の腫瘍細胞への投与による遺伝子療法により癌を治療する可能性を提供する。

遺伝子療法とは、細胞もしくは宿主された器官内に遺伝子情報を導入することにより欠陥症もしくは異常（突然変異および常軌を逸した発現など）を修正することである。この遺伝子情報は、インビトロでは器官か

ら抽出された細胞内へ導入され、その改変化細胞をその後に体内に再導入させるか、あるいはインビボで直接適切な組織内に導入するかのいずれかを行うことができる。この第二の事例では様々な技術が存在し、それらは中でもDNAとDEAE-デキストランとの複合体（Pagano et al., J. Virol. 1 (1967) 891）、DNAと核蛋白質との複合体（Kaneda et al., Science 243 (1989) 375、DNAと脂肪との複合体（Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413）、およびリポソームの使用（Fraleigh et al., J. Biol. Ch

em. 255 (1980) 10431)などを初めとする様々なトランスフェクション技術である。より最近では遺伝子の輸送のためのベクターとしてのウイルスの使用がこれらの物理学的トランスフェクション技術への有望な別法として出現した。この点で様々な細菌が、特にレトロウイルス (RSV、HMS、およびMMSなど)、HSVウイルス、アデノ関連性ウイルス、ならびにアデノウイルスにおける特定の細胞集団を感染する能力について検査されている。

癌を治療するために遺伝子療法を使用する可能性は、国際公開第91/15580号明細書において既に記載されている。この出願は、細胞培養物中のその発現が癌遺伝子のmRNAを破壊することを可能にすることができるリボザイムをコードする遺伝子を含むレトロウイルスの構築を記載している。

本発明は、アデノウイルスが腫瘍における治療的遺伝子の輸送および発現のための特に有効なベクターを作り出すということの証明からの結果に由来する。具体的には、アデノウイルスはそれらが感染した細胞の

ゲノム内に組み込まれず、非常に安定した様式でその細胞中で保持されるという利点を有し、このことが持続的な治療効果を取得することおよび非常に広範囲の宿主を有することを可能にし、このためいずれかの種類の細胞をもむす癌の治療への適用が可能になる。その上本発明は、アデノウイルスタイプのウイルスは腫瘍における細胞分裂を少なくとも部分的に直接阻害することが可能な遺伝子を選搬および発現することが可能であることの証明に基づいている。

従って本発明の第一主題は、その発現が細胞分裂を少なくとも部分的に阻害することを可能にさせる異種DNA配列を含む欠陥組換えアデノウイルスである。

本発明の主題は、癌の治療もしくは予防が意図される薬剤学的組成物の調製のためのそのような欠陥組換えアデノウイルスの使用でもある。

本発明の目的のためには、用語「欠陥アデノウイルス」は、標的細胞内で自律的に複製することが不可能なアデノウイルスを意味する。従って一般的には、本発明の構成内で用いられる欠陥アデノウイルスのゲノムは少なくとも感染細胞内での前記ウイルスの複製に必要な配列を欠損している。これらの領域は、除去する（完全、もしくは部分的に）、もしくは非機能的にさせる、もしくは他の配列お

よび特に持入される遺伝子により置換するかのいずれかを行うことができる。それにもかかわらず欠陥ウイルスはウイルス粒子の被包化に必需なそのゲノムの配列を保持することが好ましい。

構造および特性を幾分異なる様々な血清型のアデノウイルスが存在する。しかしながらこれらのウイルスはヒトおよび特に免疫抑制されていない被検体にとっては病原的ではない。これらの血清型の中でも、タ

イプ2もしくはタイプ5のアデノウイルス(Ad2もしくはAd5)が本発明の構成においては好まれる。Ad5アデノウイルスの場合では、複製に必要な配列はR1AおよびR1B領域である。

本発明の目的のためには、その発現が細胞分裂を少なくとも部分的に阻害することを可能にさせる異種DNA配列が、腫瘍抑制遺伝子(すなわち抗癌遺伝子)もしくは前駆遺伝子のいずれかの活性誘導体、標的細胞内でのその発現が細胞分裂を亢進させる遺伝子の発現を阻害することを可能にさせるアンチセンス遺伝子、あるいはその発現産物が感染細胞のアポトーシスを誘導する遺伝子から選択される少なくとも一つの遺伝子を含むことが好ましい。

本発明の構成内で用いることができる腫瘍抑制遺伝子の中でも、以下の遺伝子をより具体的に挙げることができる。

-p53遺伝子

このp53遺伝子は53kDの核蛋白質をコードする。欠損および/または突然変異によるこの遺伝子の突然変異化形態は大半のヒトの癌の進展に関与している(Baker et al., Science 244 (1989) 217)。この突然変異化形態はまた、ras癌遺伝子と一緒に協同してマウスの繊維芽細胞を形質転換させることも可能である。一方で天然のp53をコードする野生型遺伝子は、癌遺伝子の様々な組み合わせ物でトランスフェクトされた留歯頰の繊維芽細胞における形質転換中心の形成を阻害する。最近のデータは、蛋白質p53はそれ自体転写因子であり、そして他の腫瘍抑制遺伝子の発現を刺激化する可能性があることを強調している。

-Rb遺伝子

- rap 1A遺伝子

- DCC 遺伝子

-k-rev2およびk-rev3遺伝子

先に示すように、異種DNA配列は天然の腫瘍抑制遺伝子もしくは前駆抑制遺伝子の活性様体を含むことができる。このような様体は通常の分子生物

学的技術に従って、その遺伝子の配列の内の一つもしくは複数の塩基対の突然変異、欠損、置換、および/または添加により取得することができる。このようにして取得される誘導体の活性を、その後の実施例に記載されるもののような当業者に知られる検査からインビトロで確認することができる。

本発明の目的のためには、異種DNA配列は、標的細胞内でのその発現が細胞増殖に有利である遺伝子の発現もしくはそのような蛋白質をコードする細胞性mRNAの転写を調節することを可能にさせるアンチセンス遺伝子を含むこともできる。このような遺伝子は例えば、標的細胞内で細胞性mRNAに相補的なRNAへと転写され、そしてそのためその細胞性mRNAの蛋白質への翻訳を遮断することができる。

本発明の構成内で用いることができるアンチセンス遺伝子の中でもより具体的には、*ras*、*myc*、*fes*、および*c-erb B*癌遺伝子などの産生のレベルを減少させることを可能にさせるいずれかのアンチセンス配列を挙げることができる。

一般的に異種DNA配列は、標的細胞内の細胞分裂を少なくとも部分

的に阻害することが可能な遺伝子（一つもしくは複数）の発現を可能にするプロモーター配列も含む。これらは、その配列が感染細胞内で機能を行うことが可能な場合に前記遺伝子の発現の生来の原因となるプロモーター配列であることができる。これらはまた、様々な起源のプロモーター配列であることもできる（他の蛋白質の発現もしくは更には合成の原因となる）。これらは特に真核生物性遺伝子もしくはウイルス遺伝子のプロモーター配列であることができる。例えばこれらは、感染することが所望される細胞のゲノムに由来するプロモーター配列であることができる。同様にこれらは、用いられるアデノウイルスを初めとするウイルスのゲノムに由来するプロモーター配列であることができる。この点では例えば、E1A、MLP、CMV、およびRSV遺伝子などのプロモーターを挙げることができる。その上これらのプロモーター配列は、活性化用でありかつ調節的な配列の添加により改変することができる。その上、異種DNA配列が発現配列を含まない場合には、これをそのような配列の下流で欠陥ウイルスのゲノム内に

挿入することができる。誘導可能なプロモーターを使用することも可能である。

その上、本発明の他の態様では異種DNA配列は腫瘍サプレッサー遺伝子もしくはアンチセンス遺伝子に加えて、腫瘍特異的抗原をコードする遺伝子および／またはリンホカインをコードする遺伝子を含む。これらの遺伝子の組み合わせ物は実際、(i) 腫瘍内で細胞分裂を停止させること、およびそのため前記腫瘍を復帰させること、ならびに(ii) 前記腫瘍に対する抗体の免疫応答を増加させることを可能にさせる。

腫瘍特異的抗原は、腫瘍細胞の表面には出現するが、非腫瘍性の同じ細胞の表面には存在しない抗原性ユニットである。このような抗原は

一般的に腫瘍の診断のために用いられる。より最近では、これらは抗腫瘍ワクチンの調製のために記載された(欧州特許第259 212号)。しかしながらこれらは、本発明の構成内におけるもののように他の治療的遺伝子と組合わされてはいない。

リンホカインをコードする遺伝子の内では、インターロイキン(IL-1からIL-13まで)、インターフェロン、腫瘍壊死因子、コロニー刺激因子(G-CSF、M-CSF、およびGM-CSFなど)、ならびにTGF β などをコードするより具体的な遺伝子を挙げることができる。その上、リンホカインコード化遺伝子は一般的にはコーディング配列の上流に、発現配列、および標的細胞の分泌経路内に合成されたポリペプチドを向かわせるシグナル配列を含む。このシグナル配列はリンホカインの天然のシグナル配列であることができるが、しかしこれはまたいずれかの他の機能的シグナル配列もしくは人工シグナル配列であることもできる。このような構築物は具体的には非常に局所的な様式においてリンホカインレベルを増加させ、そしてそのため特に有利な効果を与える特別な種類の腫瘍に対する免疫応答を腫瘍特異的抗原の存在下で増幅することを可能にする。

本発明に従う欠陥組換えアデノウイルスは、当業者に知られるいずれかの技術により調製することができる(Levrero et al., Gene 101 (1991) 195、欧州特許第185 573号; Graham, EMBO

J. 3 (1984) 2917)。具体的にはそれらを、アデノウイルスと、中でも異種DNA配列を保持するプラスミドとの間の相同組換えにより調製することができる。相同組換えは、前記アデノウイルスおよびプラスミドの適切な細菌株内への同時トラン

スフェクション後に生じる。用いる細胞株は、(i) 前記因子による形質転換が可能であり、そして(ii) 好ましくは組換えの危険性を避ける目的で組み形體で、欠陥アデノウイルスゲノム部分に相補的であることが可能である配列を含むべきであることが好ましい。細胞株の例としては、特にAd5アデノウイルスのゲノムの左側部分をそのゲノム内に組み込んで含むヒト胎児の腎臓株293を挙げることができる(Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59)。

その後には実施例に説明されるように、増殖させたアデノウイルスを回収し、そして通常の分子生物学的技術に従って精製する。

本発明はまた、先に記載される欠陥組換えアデノウイルスの一つもしくは複数を含む薬剤学的組成物にも関する。本発明の薬剤学的組成物は、治療予定の腫瘍内に直接注入可能な製剤のための薬剤学的に許容される賦形剤を含むことが好ましい。この薬剤学的組成物は等張滅菌溶液、もしくは乾燥組成物、具体的にはその事例に依存する滅菌された水もしくは生理学的食塩水の添加の際に注射用溶液の調製を可能にする凍結乾燥化組成物であることができる。治療予定の腫瘍内への直接注入が有利であり、それはそのことが冒された組織のレベルで治療効果を濃縮することを可能にするためである。

注射のために用いられる欠陥組換えアデノウイルスの用量は様々なパラメータに従って、具体的には用いられる投与模式、関係する病状、発現予定の遺伝子、もしくはそうでなければ所望される治療の期間に従って適用することができる。一般的には本発明に従う組換えアデノウイルスは、 10^4 pfu/mlと 10^{11} pfu/mlとの間、好ましくは1

$0^6 \sim 10^{10}$ pfu/mlの用量の形態で製剤および投与される。用語pfu (

ブランク形成性ユニット)は、ウイルス溶液の感染性に相当し、そしてこれは適切な細胞培養物の感染、および一般的には48時間後の感染細胞のブランク数の測定により決定される。ウイルス溶液のp f u力価の決定のための技術は刊行物内に詳細に記載されている。

従って本発明は、癌の治療もしくは予防のための非常に有効な手段を提供する。その上この治療は、ヒト、ならびにヒツジ、ウシ、家畜動物(イヌ、およびネコなど)、ウマ、および魚などのようないずれかの動物の両方に適用することができる。

本発明は、詳細な説明でありかつ制限ではないとして考慮されるべき以下の実施例の助けにより一層完全に記載されるであろう。

図面の説明

図1:ベクターmp63wt I-。CMVの略図

図2:ベクターp63wt X。CMVの略図

一般的な分子生物学技術

プラスミドDNAの調製的抽出、塩化セシウム濃度勾配液中でのプラスミドDNAの遠心分離、アガロースもしくはアクリルアミドゲル電気泳動、電気溶出によるDNA断片の精製、蛋白質のフェノールもしくはフェノール-クロロホルム抽出、食塩水培地中でのDNAのエタノールもしくはイソプロパノール沈殿、および大腸菌(*Escherichia coli*)中での形質転換などのような分子生物学において通常用いられる方法は当業者によく知られており、そして刊行物において広範囲に記載されている[Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Ma-

nual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982; Ausubel F. M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987]。

pBR322-およびpUC-タイプのプラスミドおよびM13シリーズのフ

アージは商業的起源のものである (Bethesda Research Laboratories 社)。

連結のためにはDNA断片を、アガロースもしくはアクリルアミドゲル電気泳動によりそれらのサイズに従って分離し、フェノールもしくはフェノール/クロロホルム混合物で抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてその後供給元の推奨事項に従ってファージT4 DNAリガーゼ (Biolabs社) の存在下でインキュベートすることができる。

突出性5' 端の充填は供給元の説明書に従って大腸菌 (E. coli) DNAポリメラーゼI (Biolabs社) のクレノウ (Klenow) 断片で実施することができる。突出性3' 端の破壊は製造元の推奨事項に従って用いられるファージT4 DNAポリメラーゼ (Biolabs社) の存在下で実施する。突出性5' 端の破壊はS1ヌクレアーゼでの条件付処理により実施する。

合成オリゴデオキシヌクレオチドによるインビトロでの部位特異的突然変異誘発は、Taylor et al. [Nucleic Acids. Res. 13 (1985) 8749-8764] により開発された方法に従い、Amersham社により配布されるキットを使用し

て実施することができる。

いわゆるPCR技術 [ポリメラーゼ促進連鎖反応 (Polymerase-catalyzed Chain Reaction)、Saiki R. K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K. B. and Faloona F. A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] によるDNA断片の酵素的増幅は、製造元の説明書に従ってDNAサーマルサイクラー (thermal cycler) (Perkin Elmer Cetus社) を用いて実施することができる。

ヌクレオチド配列の検証はSanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] により開発された方法により、Amersham社により配布されるキットを用いて実施することができる。

実施例

E1. サイトメガロウイルスプロモーターの調節下にあるp53遺伝子を保持するベクターmp53wtI-CMVの構築(図1)。

真核生物の発現ベクターmp53wtI-CMVを以下のものの挿入によりプラスミドpUC19から構築した。

-サイトメガロウイルス(CMV)の初期プロモーターに相当するウイルス起源のプロモーター領域の挿入。ベクターでのこの領域はCMV/pUS連結部が非反復の制限部位EcoRI-SphIに、そしてCMV-p53連結部がBamHIにより囲まれている。プロモーター領域を挟み込む非反復部位の存在は、いずれかの他のプロモーターによるCMV領域の置換を可能にさせる。従って第二シリーズのベクターは、

p53遺伝子が誘導可能プロモーター、すなわち重金属(カドニウムおよび亜鉛)により誘導可能なメタロチオネインプロモーターの調節下に置かれて取得される。

-野生型形態をとるマウスのp53蛋白質(Zakut-Houri et al., Nature 36(1983)594)をコードするcDNAに相当する1173bpの配列の挿入。この構築物ではサプレッサー遺伝子はcDNAの形態をとり、これはすなわちイントロンを欠損しているということである。このことは具体的にはベクターのサイズを減少することを可能にさせる。その上、取得される発現レベルはイントロンの存在もしくは非存在の場合で類似していることが立証された。

-非常に効率のよいポリアデニル化シグナルに相当するSV40ウイルスの後期遺伝子のポリアデニル化シグナルの挿入。2つの非反復のSalIおよびHindIII制限部位がこのポリアデニル化シグナルの下流に位置している。これらの部位は、アデノウイルス(Cf E3)のpIX領域の挿入を可能にさせた。

E2. ベクターmp53wtI-CMVのインビトロでの活性

ベクターmp53wtI-CMVの機能性を、HeLa細胞内での過性発現によりインビトロで実証した。このためにはベクターをトランスフェクションに

よりその細胞内に導入し、そして40時間後に蛋白質p53を免疫蛍光法および免疫沈降法によりアッセイした。得られる結果は、50%を上回るトランスフェクト化細胞が高レベルの蛋白質p53を誘導することを示す。

E3. ベクターmp53pIX. CMVの構築

p53遺伝子を発現する組換えアデノウイルスを相同組換えにより作

成するのに用いたプラスミドは以下のように構築した。

真核生物性発現ベクターmp53pIX. CMVは、mp13wtI-、CMVのSalIおよびEcoRI部位との間のアデノウイルスゲノムから取得されるpIX配列の挿入により構築した。このpIX配列は組換えプラスミドpLTR-βgal pIX (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626) から、酵素EcoRVおよびHindIIIによる消化により単離した。

このように取得された発現ベクターmp53pIX. CMV (図2) は非反復のHindIII部位をpIX挿入断片の下流に有し、このことはこの構築物 (Cf E4.) の直線化を可能にする。

E4. CMVプロモーターの調節下にあるp53遺伝子を保持する欠陥組換えアデノウイルスの構築

ベクターmp53pIX. CMVを直線化し、そしてこれを欠陥アデノウイルスベクターと共に、アデノウイルスE1領域 (E1AおよびE1B) によりコードされる機能をトランスで供給するヘルパー細胞 (株293) 内に同時トランスフェクトさせる。

アデノウイルスAd. p53は、突然変異体アデノウイルスAd. d1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) とベクターmp53pIX. CMVとの間のインビボの相同組換えにより以下の方法に従って取得され、それは、酵素HindIIIによる直線化後にそのプラスミドmp53pIX. CMVとアデノウイルスd1324とをリン酸カルシウムの存在下で株293内に同時トランスフェクトさせて相同組換えを可能にさせることである。こ

のように作成された組換えアデノウイルスをプレート上での精製により選択する。単離後、組換えアデノウイルスDNAを293細胞株内で増幅させて約 10^{10} pfu/mlの力価を有する未精製の組換え欠陥アデノウイルスを含む培養上清を取得する。

ウイルス粒子は一般的に、既知の技術に従う塩化セシウム密度勾配遠心分離により精製される(特に、Graham et al., Virology 52 (1973) 456、を参照せよ)。アデノウイルスAdp53は20%グリセロール中で -80°C に保存することができる。

アデノウイルスAd-p53が培養物中の細胞を感染し、そしてその細胞培養中に野生型のp53の生物学的活性形態を発現する能力は、ヒトの293株の細胞を感染させることにより証明した。その後、培養上清中のp53の存在を、p53特異的モノクローナル抗体を使用することが明らかにした。

これらの研究は、アデノウイルスが実際に生物学的活性形態のp53を発現することを示すことを可能にする。

【図1】

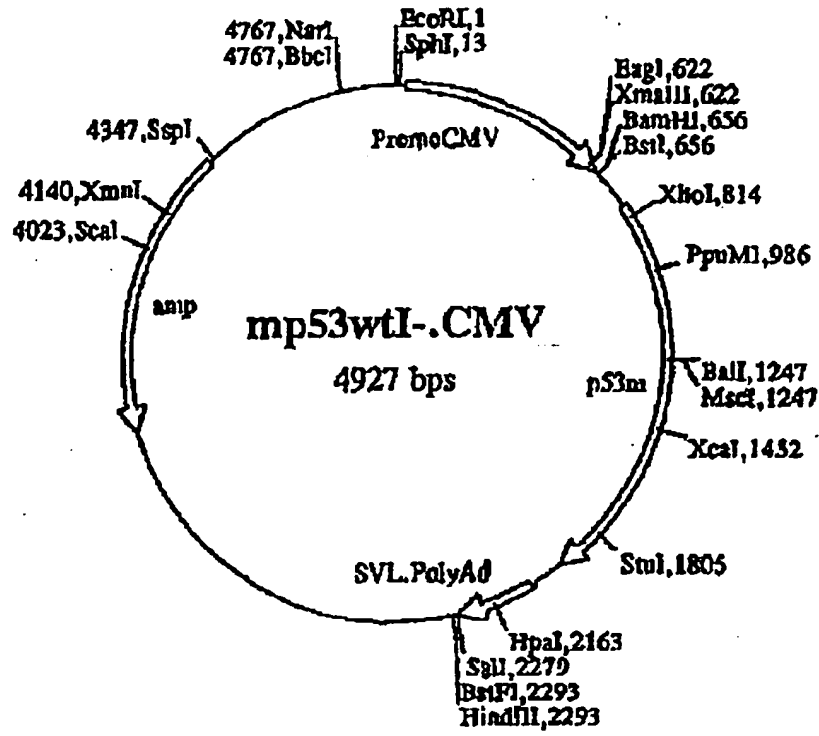


FIGURE 1

【図2】

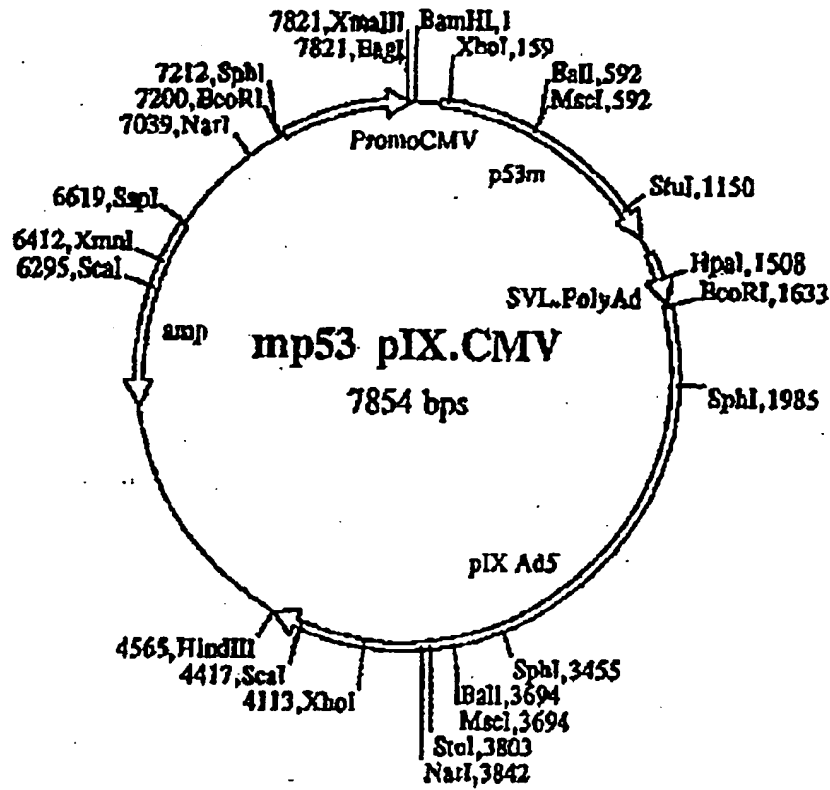


FIGURE 2

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1995年5月18日

【補正内容】

請求の範囲

1. 標的細胞内でのその発現が少なくとも部分的に細胞分裂を阻害することを可能にさせる異種DNA配列を含み、前記配列が、

—腫瘍サプレッサー遺伝子、標的細胞内でのその発現が細胞増殖に有利な遺伝子の伝写もしくは翻訳を調節することを可能にさせるアンチセンス遺伝子、およびその発現産物が感染細胞のアポトーシスを誘導する遺伝子の中から選択される少なくとも一つの遺伝子、ならびに

—前記遺伝子の感染細胞内での発現を可能にさせるプロモーター配列（前記プロモーター配列は前記遺伝子のものとは異なる起源を有する）を含む、欠陥組換えアデノウイルス。

2. 異種プロモーターの調節下に野生型p53蛋白質をコードする配列を含む、請求の範囲1に記載の欠陥組換えアデノウイルス。

3. 初期サイトメガロウイルスプロモーターの調節下に野生型p53蛋白質をコードする配列を含む、請求の範囲2に記載の欠陥組換えアデノウイルス。

4. 標的細胞中でのそれ自体の複製に必要なそれ自体のゲノムの領域を欠損することを特徴とする、請求の範囲1～3の内の一つに記載のアデノウイルス。

5. タイプAd5アデノウイルスであることを特徴とする、請求の範囲4に記載のアデノウイルス。

6. アンチセンス遺伝子が、ras、myc、fos、および/またはc-erbB遺伝子の発現のレベルを減少させることを可能にさせることを特徴とする、請求の範囲1に記載のアデノウイルス。

7. 異種DNA配列がその上に、腫瘍特異的抗原をコードする遺伝子および/またはリンホカインをコードする遺伝子を含むことを特徴とする、請求の範囲1～5の内の一つに記載されるアデノウイルス。

8. 癌の治療および/または予防が意図される薬剤学的組成物の調製のため

の、請求の範囲1~7の内の一つに記載のアデノウイルスの使用。

9. p53の突然変異形態の存在に關連する癌の治療および/または予防が意図される薬剤学的組成物の調製のための、請求の範囲2に記載のアデノウイルスの使用。

10. 治療予定の腫瘍内への直接的投与のための薬剤学的組成物の調製のための、請求の範囲8~9に記載の使用。

11. 抗腫瘍ワクチンの調製のための、請求の範囲8に記載の使用。

12. 請求の範囲1~7の内の一つに記載の一つもしくは複数の欠陥組換えアデノウイルスを含む薬剤学的組成物。

13. 注射用形態であることを特徴とする、請求の範囲12に記載の薬剤学的組成物。

14. 10^4 pfu/mlと 10^{10} pfu/mlとの間、そして好ましくは $10^6 \sim 10^{10}$ pfu/mlの欠陥組換えアデノウイルスを含むことを特徴とする、請求の範囲12に記載の薬剤学的組成物。

15. その発現産物が感染細胞のアポトーシスを誘導する遺伝子を含む異種DNA配列を含む、癌の治療および/または予防が意図される薬剤学的組成物の調製のための欠陥組換えアデノウイルスの使用。

16. 野生型p53蛋白質をコードする異種DNA配列を含む、細胞のアポトーシスを誘導することが意図される薬剤学的組成物の調製のた

めの欠陥組換えアデノウイルスの使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Appl. No.
PCT/FR 94/00421

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/12 C12N15/11		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 C12N A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation in the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY vol. SUPPL. no. 17E, 29 March 1993 page 204 WILLS, K.N. & MENZEL, P. 'Adenovirus vectors for gene therapy of cancer' voir résumé S 216	1,4,5,9, 11
X,O	& Keystone Symposium on genetically targeted research and therapeutics. Antisense and gene therapy, Keystone, USA ;12 au 18 Avr-11 1993 --- -/-	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family numbers are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the priority date of the art which is not considered to be of particular relevance; "E" earlier document but published on or after the international filing date; "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other special reason (as specified); "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means; "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed.		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but drawn to attention of the examiner or examiner's attention "X" document of particular relevance; the document is considered to involve an inventive step when the document is taken alone. "Y" document of particular relevance; the document is considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu- ments, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document number of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 July 1994		Date of mailing of the international search report - 4. 08. 94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2911, P.O. Box 2 NL - 2280 MV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-3441. Tlx. 31 661 500 01 Fax (+31-70) 340 3015		Authorized officer Chambonnet, F

Form PCT/ISA/20 (second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Application No.
 PCT/FR 94/00421

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
P,X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY vol. SUP, no. 18A, 4 January 1994 page 237 GREGORY, R.J. ET AL. 'Tumor suppressor gene therapy of cancer: adenoviral mediated gene transfer of the p53 cDNA into human tumor' voir résumé D2 307 ---	1-6,9, 11,13-15
P,X	WO,A,93 19191 (CNRS, INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 30 September 1993 see the whole document ---	1-3,9-15
X	WO,A,93 03769 (USA DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 4 March 1993 see page 10, line 1 - line 5; claims 1-5,12,13; figure 1 ---	1-5,8,9, 11-15
E	WO,A,94 10323 (IMPERIAL CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LTD) 11 May 1994 see page 14, line 20 - page 19, line 28; example 3 ---	1-9, 11-15
A	AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASES vol. 145, no. 4 P2, April 1992 page A425 BRODY, S.L. ET AL. 'In vivo gene transfer to malignant mesothelioma using an adenovirus vector' ---	1
O,A	& 1992 International Conference of the American Lung Association and the American Thoracic Society Miami Beach, USA; 17-20 Mai 1992 -----	1

Form PCT/ISA/210 (Continuation of revised sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.

PCT/FR 94/00421

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
WO-A-9319191	30-09-93	FR-A- 2688514 AU-B- 3757093 CA-A- 2102302 EP-A- 0593755	17-09-93 21-10-93 17-09-93 27-04-94
WO-A-9303769	04-03-93	AU-A- 2500692 CA-A- 2115742	16-03-93 04-03-93
WO-A-9410323	11-05-94	NCNE	

Form PCT/ISA/210 (specimen family sheet) (July 1993)

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	FI
C 1 2 N 7/00		8931-4B	C 1 2 N 7/00
/(C 1 2 N 15/09	ZNA		
C 1 2 R 1:92)			
(72)発明者	メ、エブリヌ		
	フランス国エフ-75011パリ・リュデュシ		
	ユマン-ペール67		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.